

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591616

研究課題名（和文） スニップマイクロアレイおよび幹細胞に基づく悪性神経膠腫の新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel therapy for malignant glioma based on the SNIP-microarray analysis and Glioma Cancer Stem cell theory

研究代表者

中村 英夫 (NAKAMURA HIDEO)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30359963

研究成果の概要（和文）：我々は、悪性神経膠腫の薬剤耐性のメカニズムを解明するために、グリオーマ幹細胞に着目し、それらの生物学的特性を検討した。臨床サンプルから、グリオーマ幹細胞を特殊な培養条件で継代することで幹細胞の性質を維持することができ、それらを用いて薬剤耐性の実験を行った。スニップマイクロアレイによってグリオーマ細胞のゲノムのプロファイルをすべて明らかにした上で、ゲノム異常の差による幹細胞の薬剤感受性の違いを明らかにした。p53 遺伝子の異常があると薬剤感受性が低い傾向が認められた。また、幹細胞を分化させることによって薬剤感受性が高まる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We focused on the biological property of glioma cancer stem cell to investigate the mechanism of drug resistance in malignant glioma. We could maintain the property of stem cell by culturing under the special condition and did an experiment of the biology of drug resistance. We investigated the genomic profiles of glioma cells using SNIP-microarray and found that genetic alterations such as p53 reduced the sensitivity of drugs. While, we also found that differentiation of the glioma cells contributed to the sensitivity of drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌幹細胞という概念が提唱され、神経膠芽腫にもグリオーマ幹細胞

(Glioma Stem cell, 以下 GSC と示す) の存在が報告された。この GSC が神経膠芽腫の治療である放射線治療、化学療法に抵

抗性を示すことが示唆されたことにより、今までの悪性グリオーマの治療成績が向上しない理由もうなづけた。

(2) 従来の放射線治療や化学療法ではなく、GSC を特異的にターゲットにする治療

法を開発することで、悪性グリオーマの治療成績の向上が期待された。GSCの分子生物学的特性も解明されつつあり、平行して様々な新規治療法の開発も試みられている。

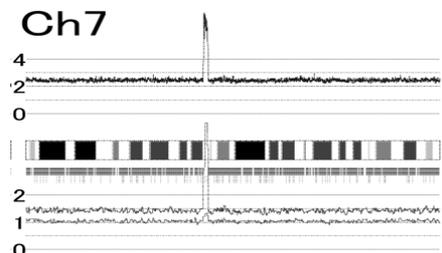
2. 研究の目的

(1) 我々はこの GSC の治療抵抗性のメカニズムを分子生物学的に解明することを目的としている。今まで、神経膠芽腫の摘出サンプルより樹立したグリオーマ幹細胞の培養細胞を利用して、スニップマイクロアレイによるゲノムプロファイリングおよび RNA プロファイリングにてグリオーマ幹細胞に特異的な分子をいくつか同定する。

(2) これらの中で薬剤耐性のメカニズムに関与する分子を選択し、その機能解明をおこなうことにより、GSC をターゲットにできる分子標的治療を確立する。従来の治療法では治療できない神経膠芽腫に対して GSC をターゲットにした分子標的治療の臨床応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SNIP マイクロアレイによる解析を続行しつつ、可能な限り悪性グリオーマ腫瘍幹細胞株の樹立の数を増やしことを目標とした。ゲノム変異が異なった悪性グリオーマ腫瘍幹細胞株を樹立し、それ以後の実験に使用できるようにした。図1に示すごとく SNIP マイクロアレイによる解析がすべての染色体において解析された。



(図1) 7番染色体の EGFR の増幅の例

(2) 細胞株の薬剤耐性については、悪性グリオーマに使用される頻度の高いテモゾロマイド (TMZ)、ACNU、シスプラチン (CDDP) などを用いて MTT アッセイなどにて評価した。それぞれの薬剤に対して、耐性株、非耐性株を評価し、もっとも代表的な細胞株をそれ以後の実験に使用した。

(3) 悪性グリオーマの薬剤耐性株、非耐性株におけるゲノム変異の比較を行った。特徴的なゲノム変異を同定し、そのゲノム上の分子を検索し、薬剤耐性に関与する分子の候補を選択した。候補分子の同定にはプロテオミクス解析を用いた。

(4) 同定した分子の発現抑制系において

は iRNA、高発現系に関しては Vector を用いてトランスフェクションの実験を培養細胞にておこなった。すなわち、同定した分子の発現を調節することで薬剤耐性に変化が出るかどうかを検証した。

(5) ノードマウスの脳に樹立した GSC を移植し、in vivo における薬剤耐性実験をおこなうことを計画した。

4. 研究成果

最終的には GSC をターゲットにした分子標的治療の臨床応用が目的であるが、まず GSC に特異的な分子の同定を行い、いくつかの候補遺伝子を同定した。これらの分子の機能を明らかにする必要があったが、多くの分子は機能が解明されておらず、またどのような細胞内シグナル上にある分子なのかさえも分かっていなかった。そこで、いくつかの分子では細胞内強発現のシステムおよび、iRNA にて細胞内での発現を抑制するシステムを構築した。更に、同定された分子をこれらのシステムでグリオーマ細胞株および GSC 株をもちいて薬剤耐性の関与を明らかにすることを試みた。現在、いくつかの分子をグリオーマ細胞株にて強発現することでテモダールという抗がん剤に抵抗性を示す可能性がある分子も同定されており、それらの検証を行っている。また、動物実験にて生体内での薬物耐性をも証明することも計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

① Nakamura H. (他4名、1番目) Can MRI-derived factors predict the survival in glioblastoma patients treated with postoperative chemoradiation therapy? Acta Radiol. 54:214-20. 2013 (査読あり)

② Nakamura H., Makino K., Kuratsu J. Molecular and clinical analysis of glioblastoma with an oligodendroglial component (GBMO). Brain Tumor Pathol. 28:185-90. 2011 (査読なし)

③ Nakamura H, Makino K, Kuratsu J. (他 2名、1番目) Therapy-associated secondary tumors in patients with non-germinomatous malignant germ cell tumors. J Neurooncol. 2011 Nov;105(2):359-64. (査読あり)

④ Nakamura H, Makino K, Kuratsu J. (他 2名、1番目) Evaluation of neoadjuvant therapy in patients with nongerminomatous malignant germ cell tumors. J Neurosurg Pediatr. 7:431-8. 2011 (査読あり)

⑤ Takezaki T, Hide T, Nakamura H, Kuratsu J. (他 2名、4番目) Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. Cancer Sci. 102:1306-12. 2011 (査読あり)

⑥ Hide T, Nakamura H, Kuratsu J. (他 3名、5番目) Combination of a ptgs2 inhibitor and an epidermal growth factor receptor-signaling inhibitor prevents tumorigenesis of oligodendrocyte lineage-derived glioma-initiating cells. Stem Cells. 29:590-9. 2011 (査読あり)

⑦ Muta D, Makino K, Nakamura H, Kuratsu J. (他 2名、3番目) Inhibition of eIF4E phosphorylation reduces cell growth and proliferation in primary central nervous system lymphoma cells. J Neurooncol. 101:33-9. 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 7件)

① 中村英夫、牧野敬史、秀 拓一郎、黒田 順一郎、篠島直樹、倉津純一 : Grade III グリオーマにおける遺伝子変化と臨床的予後との関係
第30回日本脳腫瘍学会 2012. 11. 25-27 グ

ランドプリンスホテル広島 (広島)

② 中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、倉津純一 : 全摘出不可能な神経膠芽腫における部分摘出術の意義 第71日本脳神経外科学会学術総会 2012. 10. 17-19 大阪国際会議 (大阪)

③ Hideo Nakamura, Keishi Makino, Takuichiro Hide, Shigetoshi Yano, Jun-ichi Kuratsu: Genetic alterations in glioma by using SNIP-Microarray The 10th Meeting of European Association of Neuro-oncology 2012. 09. 6-9, PARC CHANOT - Marseille Exhibition and Convention centre (Marseille, France)

④ Hideo Nakamura, Keishi Makino, Takuichiro Hide, Jun-ichi Kuratsu: Evaluation of the therapeutic outcome and QOL in the patients with intracranial germinoma. - a single institution study- The 15th International symposium on Pediatric Neuro-Oncology 2012. 06. 24-27 Conference Venue Sheraton Centre Hotel (Toronto, Canada)

⑤ 中村英夫、牧野敬史、倉津純一 : MRI画像で grade 2 相当の病変であるが、病理学的には grade 3 glioma が疑われる 1 症例 第30回日本脳腫瘍病理学会 2012. 05. 24-26 名古屋国際会議場 (名古屋)

⑥ Hideo Nakamura, Keishi Makino, Takuichiro Hide, Yukitaka Ushio, Jun-ichi Kuratsu : Title : Evaluation of the therapeutic outcome and QOL in the patients with intracranial germinoma. - a

single institution study- The 9th Meeting of Asian Society of Neuro-oncology 2012. 04. 20-22 Taipei International Convention Center (Taipei, Taiwan)

⑦ 中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、倉津純二：高齢者悪神経膠芽腫の治療成績の検討 第 25 回日本老年脳神経外科学会、2012.3.16 松元市民芸術館（松本）

〔図書〕（計 4 件）

① 中村英夫、倉津純一、メディカ出版 脳神経外科速報 膠芽腫治療の進歩～遺伝子解析のインパクト～ 2012、pp1276-1288

② 中村英夫、倉津純一、メディカ出版 ブレインナーシング 2010 夏季増刊号 神経膠腫 2010、pp138-145

③ 中村英夫、倉津純一、シナジー出版、脳腫瘍診断における PET 検査の意義と目的 脳神経検査のグノーティ・セアウトン part 2 この検査では、ここが見えない 2010、pp99-103

④ 中村英夫、倉津純一、なるにあ編集室、脳腫瘍の外科、神経膠芽腫の患者 QOL に対する外科的手術の評価脳腫瘍の外科 2010、pp96-99

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 英夫 (NAKAMURA HIDEO)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30359963

(2) 研究分担者

牧野 敬史 (MAKINO KEISHI)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90381011

(3) 研究分担者

秀 拓一郎 (HIDE TAKUICHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40421820

(4) 研究分担者

倉津 純一 (KURATSU JUN-ICHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：2045296

(5) 連携研究者

小川 誠司 (OGAWA SEISHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60292900